

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Über die Fragmentierung von IgG-Globulin mittels Diphthin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hans-Christoph Weise
aus Hartfelde

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Über die Fragmentierung von IgG-Globulin mittels Diphthin



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Hans-Christoph Weise
aus Hartfelde

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg an der Lehn
am 1.12.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr. med. R. Siegert

Referent: Dozent Dr. med. W. Schiff

Correferent: Professor Dr. med. R. Siegert

Inhaltsverzeichnis

=====

	<u>Seite</u>
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Untersuchungen und Ergebnisse</u>	5
A. Zur Methodik	5
B. Quantitative Untersuchungen über den Diphthineffekt auf menschliches IgG-Globulin	6
C. Isolierung der IgG-Diphthinquoten I und II von Menschen- und Kaninchenserum	8
D. Physikalisch-chemische Eigenschaften der beiden IgG-Globulin-Diphthinfragmente	13
E. Über die Antikörpereigenschaften der beiden Diphthinfragmente $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc	15
F. Über die antigene Differenzierung der beiden IgG-Globulin-Diphthinfragmente	17
G. Über die Bedeutung von Cystein bei der Diphthinbehandlung von IgG-Globulin	22
III. <u>Besprechung</u>	29
IV. <u>Zusammenfassung</u>	32
V. <u>Literatur</u>	34



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. Einleitung

Durch die Arbeiten von PORTER (1959) und EDELMAN (1959), die IgG-Globulin von Kaninchenserum mittels Papain bzw. von Menschenserum mittels Mercaptoäthanol aufspalteten und die hierbei erhaltenen Fragmente chemisch, physikalisch und immunologisch untersuchten, erfuhren die Bemühungen um eine Aufklärung der Struktur der Immunglobuline entscheidende Impulse. Die nachfolgend von zahlreichen Autoren gewonnenen Erkenntnisse führten zu verschiedenen Modellvorstellungen vom Aufbau des IgG-Globulinmoleküls (PORTER, 1962; FLEISCHMANN, PORTER und PRESS, 1963; NISONOFF und THORBECKE, 1964; EDELMAN und GALLY, 1964; NOELKEN u. Mitarb., 1965; SCHULTZE, 1965). Wegen seiner Einfachheit und Übersichtlichkeit fand das Schema nach PORTER, das in der Abbildung 13 (s. S. 28) in anderem Zusammenhang wiedergegeben ist, besondere Beachtung. Wie dort veranschaulicht ist, besteht das Molekül des IgG-Globulins (und zwar des normalen wie des immunen, gleichermaßen beim Mensch und beim Kaninchen) aus 2 schwereren γ -Ketten vom Molekulargewicht 50.000 und 2 leichteren (unter sich antigen verschiedenen) κ - und λ -Ketten vom Molekulargewicht 22.000 (EDELMAN und GALLY, 1962). Synonyma für die γ - und κ - bzw. λ -Ketten (Bull. World Health Org., 1964) sind H(=heavy)- bzw. L(=light)-Ketten (EDELMAN und GALLY, 1962) sowie A- bzw. B-Ketten (FLEISCHMANN, PAIN und PORTER, 1962). Im nativen Molekül sind diese 4 Polypeptidketten durch Wasserstoff- und 3 - 5 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Mittels Mercaptoäthanol werden diese Bindungen gelöst und die hierdurch freigesetzten 4 Ketten können (z. B. durch Gelfiltration mit Sephadex G-75) gemäß ihren Molekulargewichten als 2 Fraktionen gewonnen werden (EDELMAN, 1959; FLEISCHMANN, PAIN und PORTER, 1962; EDELMAN und GALLY, 1962). Demgegenüber bewirkt eine Behandlung mit Papain in Gegenwart von Cystein eine Dreiteilung des Moleküls. PORTER (1959) isolierte diese Fragmente von Kaninchen-IgG-Globulin durch Ionenaustauschchromatographie auf Carboxymethylcellulose zu etwa

gleichen Gewichtsanteilen und bezeichnete sie in der Reihenfolge ihrer Eluierung mit I, II und III. Von menschlichem IgG-Globulin wurden entsprechende Bruchstücke erhalten, die von EDELMAN, HEREMANS und KUNKEL (1960) gemäß ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit S (= slow), als einem Gemisch von zwei weitgehend identischen Bruchstücken, und F (= fast) genannt wurden. Die Fragmente I und II bzw. die beiden S-Bruchstücke haben ein Molekulargewicht von etwa 45.000, bestehen aus einem γ -Kettenanteil und einer κ - oder λ -Kette und besitzen Antikörperaktivität. Demgegenüber hat das Fragment III bzw. F ein Molekulargewicht von 55.000 und ist frei von κ/λ -Ketten und ohne Antikörperfunktion (PORTER, 1959, 1964; FLEISCHMANN, PAIN und PORTER, 1962). Trotz dieser analogen Eigenschaften unterscheiden sich die vergleichbaren Fragmente von Menschen- und Kaninchen-IgG-Globulin jedoch in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit: Während die Fragmente S beim Menschen und I/II beim Kaninchen ungefähr die gleiche elektrophoretische Beweglichkeit wie das jeweilige intakte IgG-Globulin besitzen, bewegt sich das Fragment F schneller und das entsprechende Fragment III langsamer (FAHEY, 1962). Ohne Berücksichtigung der Herkunft werden zur Vereinheitlichung neuerdings die einzelnen univalenten Bruchstücke I/II bzw. S mit Fab (ab = antigen binding) und das Fragment III bzw. F mit Fc (c = cristallizable) bezeichnet (Bull. World Health Org., 1964). - Weitgehend gleiche Struktur wie das IgG-Globulin besitzen offensichtlich die anderen Immunglobuline, wobei z. B. das IgM-Globulin aus 6 dem IgG analogen Untereinheiten vom Molekulargewicht von 150.000 zusammengesetzt ist, während das Bence-Jones-Globulin nur aus 2 κ - bzw. λ -Ketten besteht.

Die zwischen den einzelnen Immunglobulinen bestehenden antigenen Unterschiede sind auf differente H-Ketten zurückzuführen. Aus diesem Grunde werden sie beim IgA als α -, beim IgG als γ - und beim IgM als μ -Ketten bezeichnet. L-Ketten vom κ - oder λ -Typ sind hingegen in allen Immunglobulinen enthalten, was die im Ouchterlony-Test nachweisbaren Kreuzreaktionen erklärt.

Das nur aus γ -Kettenanteilen bestehende Fc-Fragment von IgG-Globulin ist demzufolge IgG-typenspezifisch, während die Fab-Fragmente, auf Grund ihrer κ/λ -Kettenanteile, darüberhinaus Kreuzreaktionen mit den anderen Immunglobulinen ergeben. Was die Antikörperqualitäten betrifft, so besitzen die isolierten Fab-Fragmente wie auch die γ -Ketten nur noch den Effekt blockierender bzw. univalenter Antikörper. Die κ/λ -Ketten verhalten sich zwar serologisch indifferent, da sich jedoch ihre elektrophoretische Beweglichkeit durch Zusatz spezifischer Haptene ändern kann, scheinen sie irgendwie an der kompletten Antikörperwirkung beteiligt zu sein. Die Fähigkeit eines Antikörpers, Komplement zu fixieren, ist hingegen an das Fc-Fragment bzw. an den dortigen γ -Kettenanteil gebunden.

Anstelle von Papain haben andere Autoren Fragmentierungsversuche vor allem mit Pepsin durchgeführt. Hierbei haben u. a. NISONOFF, WISSLER und WOERNLEY (1959) festgestellt, daß neben zahlreichen niedermolekularen Peptiden ein 5 S-Bruchstück vom Molekulargewicht 105.000 entsteht, das der Summe der beiden Papainfragmente Fab entspricht. Dieses Fragment, das in Angleichung an die Papainfragmente mit $F(ab')_2$ bezeichnet wird, besitzt die Wirkung kompletter Antikörper und kann durch ein beliebiges Sulfhydryl-Reagens in zwei identische Fragmente Fab' zerlegt werden, was bei nativem IgG-Globulin nicht möglich ist (NISONOFF u. Mitarb., 1960). (Für eine eingehende Information über vorstehend skizzierte Untersuchungen sei auf folgende Übersichtsarbeiten hingewiesen: FAHEY, 1962; PORTER, 1964; COHEN und PORTER, 1964; SINGER, 1965; GOLD und HOLLÄNDER, 1966) Nach GOLD und HOLLÄNDER (1966) sollen alle eiweißspaltenden Fermente, die durch Sulfhydrylgruppen aktivierbar sind, einen ähnlichen Spalteffekt auf Immunglobuline besitzen. Möglicherweise trifft dies auch für bakterielle Proteinasen zu. So hat POULIK (1959, 1961, 1963) bei seinen Untersuchungen über den Einfluß von gereinigtem Diphtherietoxin auf Menschenserum festgestellt, daß einige Toxinpräparate außer einer Veränderung der elektrophoretischen Beweglichkeit einiger Globulinfraktionen eine Verdoppelung der IgG-Globulinbande verursachen. Während POULIK (1963) diesen Effekt auf einen Gehalt der Präparate an Neuraminidase zurückführte, erklärte ihn SCHIFF (1965) mit der Wirkung des in Diphtherie-

toxin als Ballaststoff enthaltenen Polypeptids Diphthin. Diese von SCHIFF (1961, 1964c) aus Kulturfiltraten von toxischen und atoxigenen Stämmen von *Corynebacterium diphtheriae* isolierte Substanz bewirkt eine agar- und immunoelektrophoretisch nachweisbare Trennung der IgG-Globuline von Menschen-, Affen- und Kaninchenserum in 2 Subfraktionen (SCHIFF, 1964d; SCHIFF und STOCKAMP, noch unveröffentlicht). Eine Beeinflussung anderer Serumproteine, vor allem von IgA- und IgM-Globulinen, und der IgG-Globuline bei 9 weiteren Tierarten konnten agar- und immunoelektrophoretisch nicht nachgewiesen werden. Diphthinbehandelte IgG-Plasmocytomserum zeigten eine Aufspaltung der Paraproteinfraktion in ebenfalls zwei, in einigen Fällen sogar in drei Quoten.

Um weitere Kenntnisse über diese globulinspaltende Wirkung des Diphthins zu erhalten, war für vorliegende Arbeit die Aufgabe gestellt, seinen Effekt auf gereinigtes IgG-Globulin von Mensch und Kaninchen zu studieren, die einzelnen diphthinbedingten Globulinquoten zu isolieren und ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften näher zu untersuchen.

II. Untersuchungen und Ergebnisse

A. Zur Methodik

Reinigung von Diphthin:

Die Reinigung von Diphthin erfolgte nach dem von SCHIFF (1964d) mitgeteilten Verfahren aus Kulturfiltraten (POPE-Bouillon, 10-täg. Bebrütung bei 33°C) des atoxigenen Diphtheriebakterienstammes 29619. Im wesentlichen handelt es sich hierbei um eine Ausfällung diphthinreichen Materials aus Kulturfiltrat mit Methanol und Äther, Entfernung weiterer Ballaststoffe durch Aufnahme des Präzipitats in HCl, Lösung des in HCl unlöslichen Rückstandes in Wasser, Behandlung dieser Lösung mit einer homogenen Phenol-Wassermischung in Wärme nach der Methode von WESTPHAL und Mitarb. (1952), Ausfällung des Diphthins aus der Phenolphase mittels Methanol und anschließende Gefriertrocknung. Die Diphthin-Trockensubstanz wurde bei + 5°C verschlossen aufbewahrt. Für jeden Versuch sind frisch angesetzte Diphthinlösungen verwandt worden.

Reinigung von IgG-Globulin bzw. IgG-Myelom-Globulin:

Nach Dialyse von Menschen- oder Kaninchenserum gegen 0,01 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,6) wurde das IgG-Globulin säulenchromatographisch mittels DEAE-Cellulose bei Verwendung desselben Phosphatpuffers eluiert. Nach Einengung mittels Polyäthylenglykol (Carbowax) und Dialyse gegen Aqua dest. wurde das IgG-Globulin gefriergetrocknet und bei - 15°C aufbewahrt.

Agardiffusionstest, Agar- und Immunelektrophorese:

Für diese Verfahren benutzten wir 1,25 % "Difco" Special Agar Noble in Michaelispuffer (pH 8,6; μ 0,1; 10,3 g Na-Barbital + 1,8 g Diäthylbarbitursäure + 6,8 g Na-Acetat + Aqua dest ad 1 l). Bei der Agar- und Immunelektrophorese wurde eine Laufzeit

von 75 min. bei einer Spannung von 10 V/cm eingehalten. Für die Präzipitationsversuche verwandten wir teils käufliche, teils durch Immunisierung von Kaninchen selbst gewonnene Immunsereen.

Gewinnung von Immunsereen beim Menschen und Kaninchen:

Ein menschliches Diphtherieserum stammte von einem Probanden, der im Abstand von je einer Woche 4 subc. Injektionen von jeweils 1 ml an Aluminiumhydroxyd adsorbiertem Diphtherie-Formol-Toxoid (Firma Asid, München) erhalten hatte. Nach viermonatiger Pause erfolgten 2 Auffrischungsinjektionen im Abstand von 10 Tagen.

Anti-A-Immunsereen wurden von 3 Probanden der Blutgruppe 0 erhalten, und zwar 14 Tage nach der letzten von 4 subc. Injektionen von Menschl. A-Speichel (1; 1,5; 2 und 3 ml im Abstand von jeweils 3 - 4 Tagen).

Die Gewinnung von präzipitierendem Anti-Humanglobulin erfolgte bei Kaninchen durch 6 - 8 i.v. Injektionen im Abstand von 3 - 4 Tagen von jeweils 2,0 ml Menschenserum oder 2,5%igen Lösungen einer der beiden Diphthinfractionen von menschlichem IgG-Globulin.

Die Herstellung von hämagglutinierenden (hämolysierenden) Anti-Schafblut-Immunsereen wurden bei gleichem Vorgehen Kaninchen mit 5 - 10 ml einer 10%igen Suspension von Schaf-Erythrozyten immunisiert. In allen Fällen erfolgten die Blutentnahmen 10 - 12 Tage nach der letzten Injektion.

B. Quantitative Untersuchungen über den Diphthineffekt auf menschliches IgG-Globulin

Bei der Untersuchung von Menschenseren haben SCHIFF (1965) und STOCKAMP (1966) festgestellt, daß die Spaltwirkung des Diphthins auf IgG-Globulin mit steigender Inkubationsdauer und -temperatur zunimmt. So waren zur Erzielung eines maximalen Trenneffektes, z.B. bei 9- oder 27-stünd. Inkubierung eines Vollserums mit Diphthin bei + 5°C Diphthinmendestmengen erforderlich, die ein Molverhältnis von IgG-Globulin : Diphthin von ungefähr 15 : 1

bzw. 30 : 1 ergaben. Nachdem wir IgG-Globulin (vom Menschen) säulenchromatographisch gereinigt hatten, war die Möglichkeit gegeben, diese Angaben zu überprüfen.

Bei diesem Versuch mischten wir 2%iges Normal-IgG-Globulin im Verhältnis 5 : 1 mit Diphthidlösungen, deren Diphthingehalt um den Verdünnungsfaktor 2 von 0,5 bis 0,004 % variierte. Die einzelnen Gemische wurden sodann agar- und immunoelktrophoretisch (gegen ein Anti-Humanserum vom Kaninchen) untersucht, und zwar sofort nach Mischung sowie nach 20-min., 1-, 3-, 9- und 27-std. Inkubierung bei Zimmertemperatur.

Die bei diesen Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. Demnach waren z.B. zur Erzielung eines vollen Trenneffekts für 0,5 ml einer 2%igen

Inkubations-
zeit



Abb. 1: Diphthineffekt auf IgG-Globulin (Mensch) in Abhängigkeit von Diphthinkonzentration und Inkubationszeit (22°C). (Agar- und immunoelktrophoretische Befunde schematisch)

IgG-Globulinlösung ohne Inkubierung bzw. bei 1-std. bzw. 27-std. Inkubation eine Diphthinmindestmenge von 0,5 bzw. 0,125 bzw. 0,008 mg notwendig. Bei einem Molekulargewicht des IgG-Globulins von 145.000 und des Diphthins von etwa 15.000 (SCHIFF 1964c) bestehen somit hierbei Molverhältnisse von IgG-Globulin : Diphthin von 2 bzw. 8 bzw. 125 : 1. Diese Ergebnisse bestätigen weitgehend die von SCHIFF und STOCKAMP erhobenen Befunde. Angesichts derartiger Molverhältnisse ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich bei diesem Diphthineffekt um einen enzymatischen Vorgang handelt. Hierbei ist bemerkenswert, daß bereits wenige Minuten nach Mischung eine vollständige Fraktionierung von IgG-Globulin eintritt.

C. Isolierung der IgG-Diphthinquoten I und II von Menschen- und Kaninchenserum

Zur Trennung der beiden elektrophoretisch nachgewiesenen Quoten von diphthinbehandeltem IgG-Globulin benutzten wir die präparative Zonenhochspannungselektrophorese und die Gelfiltration.

In beiden Fällen wurden Lösungen von 10 % IgG-Globulin und 0,2 % Diphthin in Michaelis-Puffer verwendet, die im Volumenverhältnis 2 : 1 gemischt und 18 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert worden waren.

1. Trennversuche mittels Zonenhochspannungselektrophorese

Wir benutzten hierfür eine Hochspannungselektrophoreseapparatur (Firma Hölzel, München), die eine Arbeitstemperatur von + 2 bis 5°C ermöglichte. Als Trägermedium diente Polyvinylchlorid Geon X-427 (Firma Serva, Heidelberg), das in Longworth-Puffer (pH 8,6; 0,1; 15 g Na-Barbital + 3,7 g Barbitursäure in Aqua dest. ad 1 l) zu einem dicken Brei aufgeschlämmt und in einem auf die Kühlplatte aufgelegten Rahmen ausgestrichen wurde. Etwa in der Mitte dieses PVC-Bettes wurde sodann quer zur Stromrichtung ein etwa 1,5 cm breiter Graben ausgehoben, der anschließend mit einem entsprechenden Brei der inkubierten IgG-Globulin/Diphthinmischung wieder aufgefüllt wurde. Nach einer Laufzeit von 15 Std. (10 V/cm) kontrollierten wir das Trennergebnis mittels eines Papierabklatsches, der mit Amidoschwarz 10 B gefärbt wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden sodann aus dem PVC-Trägerbett ausgeschnitten, mit Kochsalzlösung ausgewaschen, gegen Aqua dest. dialysiert und lyophilisiert.

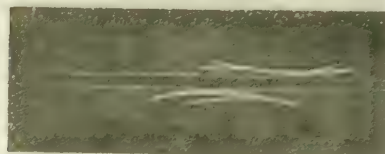
Da die bei diesen Auftrennungsversuchen erzielten Ergebnisse nicht voll befriedigten, verwerteten wir nur die aus den mittleren Trennbereichen stammenden Fraktionsteile. Die agar- und immunoelktrophoretische Auswertung der aus einem solchen Versuch gewonnenen zwei IgG-Globulin-Subfraktionen sind in der Abbildung 2 wiedergegeben. Keiner der zwei Quoten war eine der beiden sich überschneidenden Präzipitatlinien isoliert zuzuordnen, sondern sie reagierten mit einem Anti-Humanserum (vom Kaninchen) nach wie vor mit zwei Präzipitaten, und zwar völlig gemäß ihrem Anteil am Reaktionsbild des Ausgangsgemisches.

1. Quote

2. "

1. Quote

2. "



— Anti-Human

Abb. 2: Agar- und Immunoelktrophorese der beiden Diphthinquten von IgG-Globulin (Mensch) nach Isolierung durch Hochspannungselektrophorese (PVC).

2. Trennversuche mittels Gelfiltration

Das von PORATH und FLODIN (1959) entwickelte Verfahren der Gelfiltration mit hochpolymeren Dextranen bietet die Möglichkeit, Substanzgemische unabhängig von ihren elektrostatischen Eigenschaften entsprechend ihren Molekulargewichten bzw. -volumina aufzutrennen. Diese Methode war erfolgversprechend, falls sich die beiden IgG-Globulin/Diphthinfractionen hinsichtlich dieser beiden Eigenschaften unterschieden.

Eine Glassäule (90 x 3 cm) wurde mit Sephadex G-100 (Firma Pharmacia, Frankfurt/M.) gefüllt, das zuvor 48 Std. in einer Lösung von 0,01 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,6) + 0,3 M NaCl gequollen war. Der gleiche Puffer diente auch zur Aufnahme und Eluierung des inkubierten IgG-Globulin-Diphthingemischs (8 ml). Die eluierten Quoten wurden mittels Carbowax konzentriert, gegen Aqua dest. dialysiert und gefriergetrocknet.

Diese Gelfiltrationsversuche erstreckten sich auf diphthin-behandeltes IgG-Globulin von normalen und immunen Menschenserem, von menschlichen Plasmocytomseren und von normalen und immunen Kaninchen-Mischseren.

In der Abbildung 3 sind als Beispiel die Elutionskurven eines diphthinbehandelten IgG-Globulins vom Mensch, vom Kaninchen und eines Plasmocytomserums dargestellt. Die jeweils erhaltenen zwei Fraktionen sind von uns nach der Reihenfolge ihrer Elution zunächst als Diphthinfragment I und II bezeichnet worden. Bei allen untersuchten Seren wurden die Fragmente I und II im Gewichtsverhältnis von ungefähr 2 : 1 erhalten. (Zum Falle des Myelom-Serums sei ergänzend bemerkt, daß SCHIFF und STOCKAMP (noch unveröffentlicht) zwei Seren gefunden hatten, bei denen nach Diphthinzusatz agarelektrophoretisch 3 Subfraktionen auftraten, deren Beziehung zu obigen Befunden noch ungeklärt ist.)

Anfänglich trat bei diesen Versuchen ein dritter, etwas kleinerer Peak im größerem Abstand nach der 2. Quote auf. Die Vermutung, dies könne auf niedermolekulare Spaltstücke zurückzuführen sein, bestätigte sich nicht, da alle durchgeführten Eiweiß-, Aminosäure- und Zuckernachweise negativ ausfielen. Wie sich schließlich herausstellte, handelte es sich um Carbowax, mit dem das isolierte IgG-Globulin eingeeengt worden war und das aufgrund seines niederen Molekulargewichts von etwa 3.000 die Poren der Dialysierschläuche passieren konnte. Bei der späteren Verwendung einer höhermolekularen Carbowaxcharge (Mol.-Gew. 6.000 - 7.000) blieb dieser Störeffekt aus.

Die agarelektrophoretische Auswertung der bei diesen Versuchen isolierten Fragmente ist in der Abbildung 4 wiedergegeben. Wie daraus hervorgeht, sind - gleichermaßen beim Mensch und Kaninchen - die Diphthinfragmente I breitbandig wie die nativen Globuline, die Fragmente II hingegen ausgesprochen schmalbandig. Beide Fragmente, insbesondere die Fragmente II, besitzen gegenüber den nativen Globulinen eine veränderte elektrophoretische Beweglichkeit. Diese Mobilitätsänderungen sind beim Mensch und Kaninchen jeweils entgegengesetzt, wobei folgende Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit bestehen: Beim Mensch Quote II > IgG > Quote I; beim Kaninchen Quote I > IgG > Quote II. Diese gegensätzliche Beweglichkeit entspricht dem von FAHEY (1962) beschriebenen Verhalten der Papainfragmente Fab und Fc vom Mensch und Kaninchen (s. S. 2). Im Falle des wiedergegebenen Beispiels eines IgG-Globulins eines Plasmocytomserums fanden wir die bei

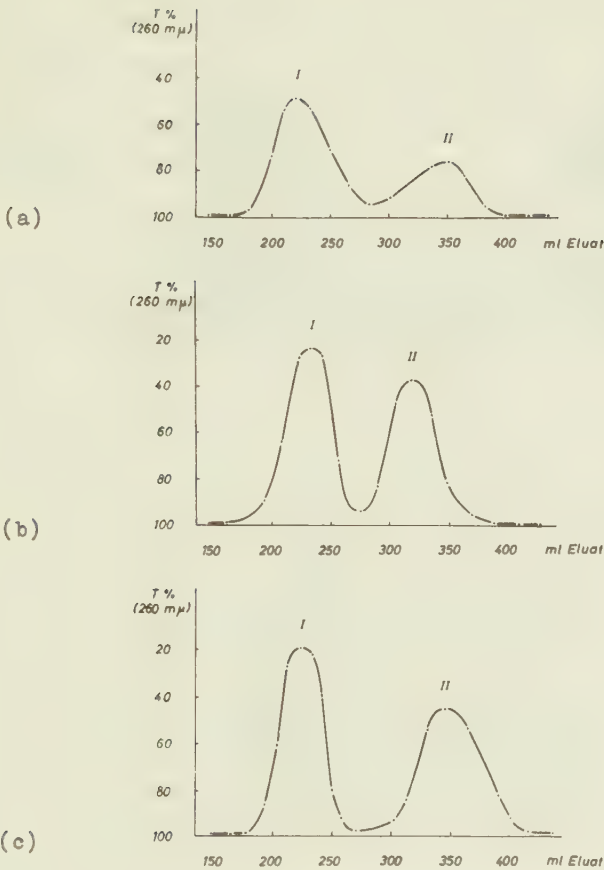


Abb. 3: Gelfiltration (Sephadex G-100) von diphthinbehandeltem IgG-Globulin vom Mensch (a), Kaninchen (b) und von einem Plasmocytom-Patienten (c). (Säule 90 x 3 cm, 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,6 + 0,3 M NaCl)

a) Menschen-Normalserum

b) Kaninchen-Normalserum



c) menschl. Plasmocytomserum

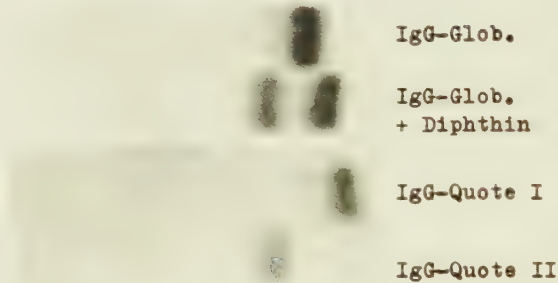


Abb. 4: Agarelektrophorese von intaktem und diphthinbehandeltem IgG-Globulin von Normalseren vom Mensch (a) und vom Kaninchen (b) und von einem menschl. Plasmocytomserum (c) sowie den jeweils isolierten Diphthinfragmenten I und II.

normalen IgG-Globulinen angetroffenen elektrophoretischen Verhältnisse besonders ausgeprägt, was auf den homogeneren Charakter dieser pathologischen Globuline zurückzuführen ist. Inwieweit in beiden Fällen tatsächlich gleiche Gegebenheiten vorliegen, sei dahingestellt, zumal SCHIFF und STOCKAMP nur bei langsamer wandernden Myeloglobulinen Diphthinfragmente mit derart differierender elektrophoretischer Beweglichkeit gefunden hatten.

D. Physikalisch-chemische Eigenschaften der beiden IgG-Globulin-Diphthinfragmente

Bei der Gelfiltration können Substanzen, deren Molekülgröße die Maschenweite des Filters übersteigt, nicht in die Raumstruktur der einzelnen Filtermoleküle eindringen und werden daher im Ausschluß auf dem kürzeren Weg der zwischenmolekularen Spalträume als erste Fraktion eluiert; kleinere Moleküle erscheinen dagegen in der Reihenfolge abnehmender Molekulargewichte, da sie zusätzlich den längeren Weg durch die engeren Filterporen nehmen müssen. Aus diesem Grunde konnte bereits bei der Gelfiltration mit Sephadex G-100 aus der Elutionsfolge der beiden Diphthinfragmente im Vergleich mit dem im Ausschluß erscheinenden unbehandelten IgG-Globulin annähernd auf deren Molekulargewichte geschlossen werden. Da das Diphthinfragment I dem unbehandelten IgG-Globulin so dicht folgt, daß keine scharfe Abgrenzung der beiden Gipfel auftritt, muß sein Molekulargewicht in der Nähe der Ausschlußgrenze, d.h. zwischen 80.000 und 100.000, liegen. Zum Diphthinfragment II bestand hingegen ein deutlicher Abstand, was auf ein erheblich geringeres Molekulargewicht hinwies. Da bei Filtrationsversuchen mit Sephadex G-75 (Ausschlußgrenze bei ca. 50.000) das Diphthinfragment II immer noch nicht im Ausschluß erschien, war für es ein Molekulargewicht von höchstens 50.000 zu erwarten.

Eine Bestimmung der Molekulargewichte der IgG-Globulin-Diphthin-Fragmente durch Sedimentations- und Diffusionsversuche verdanken wir Herrn Professor Dr. MOHRING (II. Med. Klinik der

Universität Mainz). Seinen Untersuchungen zufolge besitzen die Fragmente I Molekulargewichte von 90.000 - 95.000 ($S_{20} = 5,75$ beim Mensch, 5,03 beim Kaninchen) und die Fragmente II Molekulargewichte von 45.000 - 50.000 ($S_{20} = 3,25$ beim Mensch, 3,8 beim Kaninchen), und zwar gleichermaßen beim IgG-Globulin von Mensch und Kaninchen.

Beim Vergleich dieser Daten mit den Molekulargewichten der Papain- und Pepsinfragmente sowie bei Berücksichtigung der übereinstimmenden elektrophoretischen Beweglichkeit ist zu folgern, daß sich einerseits das Diphthinfragment I und die Summe der beiden Papainfragmente Fab bzw. das 5S-Pepsinfragment $F(ab')_2$ weitgehend entsprechen, wie andererseits auch eine Übereinstimmung zwischen dem Diphthinfragment II und dem Papainfragment Fc bestehen muß. Aufgrund dieser und weiterer Übereinstimmungen (s.später) bezeichneten wir - in Angleichung an die bei den Papain- und Pepsinfragmenten gebräuchliche Nomenklatur, das Diphthinfragment I mit $^{di}F(ab)_2$ und das Diphthinfragment II mit ^{di}Fc .

Neben ihren unterschiedlichen Molekulargewichten und ihrer verschiedenen elektrophoretischen Beweglichkeit differieren $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc auch in ihrem Lösungsverhalten. So erfolgt bei Inkubierung höher konzentrierter IgG-Globulinlösungen mit Diphthin eine Niederschlagsbildung, die sich bei einer anschließenden Dialyse gegen Aqua dest. verstärkt. Besonders reichlich und grobflockig fällt das Sediment bei der Diphthinbehandlung von IgG-Globulin vom Kaninchen aus. Durch mäßige Alkalisierung kann das Präzipitat wieder in Lösung gebracht werden. Wie agar- und immunoelektrophoretische Untersuchungen zeigten, besteht dieser Niederschlag ausschließlich aus ^{di}Fc , während $^{di}F(ab)_2$ im Überstand enthalten ist. Diese schlechte Löslichkeit von ^{di}Fc in wässrigem neutralen Milieu ist bemerkenswerterweise auch für das vergleichbare Papainfragment Fc charakteristisch (PORTER, 1959).

Ferner unterscheiden sich die beiden Diphthinbruchstücke stark hinsichtlich ihrer Hitzestabilität. Bei Erhitzung einer Lösung eines zuvor inkubierten IgG-Humanglobulin-Diphthingemischs im 100°C-Wasserbad fällt $^{di}F(ab)_2$ vollständig aus, und

es ist - wie der Abbildung 5 zu entnehmen ist - im Überstand immunoelktrophoretisch nur ^{di}Fc nachweisbar. Zum Vergleich sind die Ergebnisse eines entsprechenden Versuchs mit einem inkubierten IgG-Globulin-Papaingemisch mitangeführt. In diesem Falle war im Überstand kein präzipitierendes Globulin mehr feststellbar. Demnach sind die beiden Papainbruchstücke Fab und Fc - im Gegensatz zum Diphthinfragment ^{di}Fc - hitzelabil.

Für letzteren Versuch benutzten wir eine Lösung (pH 7,6) von IgG-Globulin (Mensch), die mit Papain (Firma Merck, Darmstadt) ohne Zusatz von Cystein 10 Std. bei 22°C inkubiert worden war.

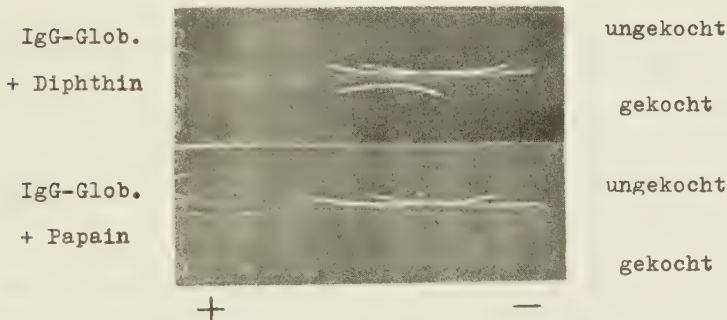


Abb. 5: Immunoelktrophorese von diphthin- bzw. papain-behandeltem IgG-Globulin (Mensch) vor und nach Erhitzung (100°C).

E. Über die Antikörpereigenschaften der beiden Diphthinfragmente $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc

Da die IgG-Globuline die hauptsächlichen Träger der Antikörperfunktion sind, war es von besonderem Interesse, zu untersuchen, inwieweit die Antikörperaktivität von IgG-Immunglobulinen durch die Behandlung mit Diphthin beeinflusst wird. Für diese Versuche verwandten wir ein menschliches Toxoplasmoseserum, zwei Seren

von Menschen, die mit A-Blutgruppensubstanz (menschl. A-Speichel) bzw. mit Diphtherietoxoid immunisiert worden waren, sowie ein Anti-Schafblut-Immunserum und ein präzipitierendes Anti-Humanserum vom Kaninchen (s. Methodik). Hierbei sind jeweils gleichzeitig die nativen Seren, die isolierten IgG-Globulinfractionen (2%ig) und deren Diphthinfragmente $^{di}F(ab)_2$ (1,4%ig) und ^{di}Fc (0,7%ig) serologisch untersucht worden.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, besaßen die isolierten IgG-Globuline mehr oder weniger die gleichen Antikörpertiter wie die nativen Seren; lediglich bei den Hämagglutininen des Anti-A-Serums war eine starke Titereinbuße festzustellen.

Art des Serums	Unters.- Methode	Nativ	IgG-Glob.	$^{di}F(ab)_2$	^{di}Fc
Diphtherieserum (Mensch)	Agar- Diff.- Test	+	+	+	-
Anti-Humanserum (Kaninchen)	Agar- Diff.- Test	+	+	+	-
Toxoplasmoseserum (Mensch)	Sabin- Feldman-T.	64000	16000	256	-
	KBR	20	Eigen- hemmung	-	-
Anti-A-Serum (Mensch)	Hämaggl.-R.	32000	1024	1024	-
Anti-Schafblut- Immunserum (Kaninchen)	Hämaggl.-R.	64000	16000	16000	-
	Hämolys.-R.	16000	4000	-	-

Tab. 1: Antikörpergehalt bei nativen Menschen- und Kaninchen-Immunseren, deren isolierten IgG-Globulinfractionen und der Diphthinfragmente $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc .

(Anti-A-Hämolysine waren im Serum nicht enthalten.) Bei den beiden Diphthinf Fragmenten beschränkte sich die Antikörperaktivität ausschließlich auf $^{d1}F(ab)_2$, und zwar gleichermaßen beim Mensch und Kaninchen. Bemerkenswerterweise waren unter den nachgewiesenen bivalenten Antikörperfragmenten keine hämolysierenden bzw. komplementbindenden Eigenschaften mehr zu finden und die Titer des SABIN-FELDMAN-Tests waren stark reduziert. Mit dem Nachweis dieser bivalenten Antikörperfragmente erhielt die gefundene Übereinstimmung von Diphthinf fragment $^{d1}F(ab)_2$ und Pepsinfragment $F(ab')_2$ eine weitere Bestätigung.

F. Über die antigene Differenzierung der beiden Diphthinf fragmente

Wie von SCHIFF (1964d, 1965) nachgewiesen wurde, bilden die nach Diphthinbehandlung von Menschen- oder Kaninchenserum entstehenden zwei IgG-Globulinquoten mit jeweils spezifischen Antiseren zwei getrennte, sich überschneidende Präzipitationslinien. Diese Befunde sprachen dafür, daß die beiden Fragmente $^{d1}F(ab)_2$ und ^{d1}Fc differente Antigene besitzen. Nachstehende eingehendere Untersuchungen der antigenen Verhältnisse beschränkten sich auf die Fragmente von menschlichem IgG-Globulin.

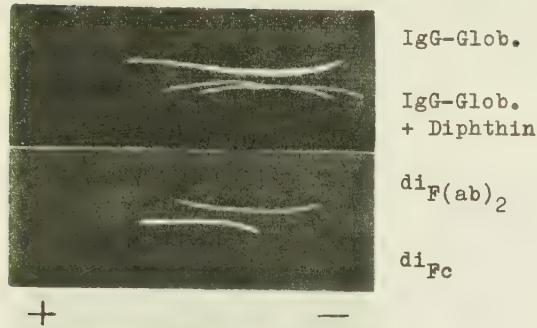
Um spezifisch gegen die beiden Diphthinf fragmente gerichtete Immunseren zu erhalten, führten wir bei Kaninchen entsprechende Immunisierungen durch. Von 6 Kaninchen, die mit $^{d1}F(ab)_2$ immunisiert worden waren, äußerten 4 eine Immunantwort. Hierbei war im Serum nur eines Tieres ein isoliert gegen dieses Antigen gerichteter Antikörper nachweisbar, während die drei anderen Seren zusätzlich Präzipitine gegen ^{d1}Fc enthielten. Von 6 weiteren, mit ^{d1}Fc immunisierten Kaninchen sprachen 5 Tiere an. Hiervon hatten 3 Kaninchen Antikörper gegen beide Fragmente gebildet, während im Serum der beiden übrigen Tiere bemerkenswerterweise nur Präzipitine gegen das im applizierten Antigen nur in Spuren vorhandene $^{d1}F(ab)_2$ festzustellen waren. Offenbar stellt das größere Fragment $^{d1}F(ab)_2$ für Kaninchen ein wirksameres Anti-

gen dar als das kleinere ^{di}Fc . Hiermit würde auch die Erfahrung übereinstimmen, daß manche Kaninchen fast nur Anti- $^{di}F(ab)_2$ bilden, auch wenn sie mit beiden IgG-Globulinantigenen (als intaktes oder diphthinbehandeltes Globulin) immunisiert worden waren. (Die Möglichkeit zu dieser Beobachtung ist nur dann gegeben, wenn bei der Immunoelktrophorese als Antigen kein natives, sondern diphthinbehandeltes IgG-Globulin verwendet wird.)

Bei Verwendung von Anti-Humanprotein- oder Anti-IgG-Globulin-Immunseren gelangten wir zu folgenden Ergebnissen: Wie in der Abbildung 6 veranschaulicht ist, ergab jedes der beiden Diphthinfragmente mit Anti-IgG-Globulin eine isolierte Präzipitationslinie; lediglich bei $^{di}F(ab)_2$ war am langsam wandernden Bogenende eine kurze zweite Linie sichtbar, die offensichtlich in Beziehung zu ^{di}Fc stand. Diese kleine Zusatzlinie war durch Rechromatographie nicht zu beseitigen. Da sie auch noch nach Denaturierung von $^{di}F(ab)_2$ durch Kochen nachweisbar war, und zwar in diesem Falle isoliert, dürfte sie durch Beimengung an hitzestabilem ^{di}Fc bedingt gewesen sein. (Das Kochen einer inkubierten Lösung von IgG-Globulin und Diphthin dürfte eine einfache Methode zur Gewinnung des Fragments ^{di}Fc darstellen.)

Die mit der OUCHTERLONY-Technik erhaltenen Befunde sind in der Abbildung 7 wiedergegeben. Aus a) ist ersichtlich, daß das Anti-IgG-Humanglobulin (vom Kaninchen) mit dem nativen IgG-Humanglobulin eine einzige, mit dem diphthinbehandelten hingegen zwei (parallele) Präzipitatlinien bildet; die letzteren vereinen sich mit der ersteren und sind den beiden Diphthinfragmenten zuzuordnen. Bei b) beweist die Überschneidung der von den beiden Fragmenten gebildeten Präzipitationslinien, daß $^{di}F(ab)_2$ und ^{di}Fc keine gemeinsamen Antizene besitzen. Für das Vorliegen antigener Unterschiede sprechen auch die Befunde c), die bei Verwendung fragmentspezifischer Antiseren erhalten werden: Nach Absorption des Anti-Human-Globulinserums mit einem der beiden Diphthinfragmente reagiert ein solches Serum jeweils nur noch mit dem anderen Fragment. Bei d) sind die genannten antigenen Verhältnisse insgesamt ablesbar. - Es darf angenommen werden, daß entsprechende Unterschiede auch bei den Diphthinfragmenten des IgG-Globulins von Kaninchenserum bestehen.

a) menschl. Normalserum



b) menschl. Plasmocytomserum

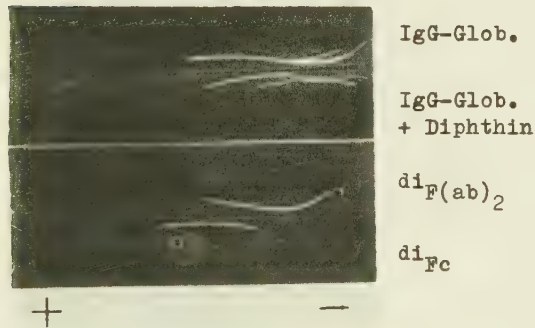


Abb. 6: Immunelektrophorese von intaktem und diphthin-behandeltem IgG-Globulin von menschl. Normal- und Plasmocytomserum und von deren Diphthinfragmenten.

Um die von uns gefundene, weitgehende Identität der Diphthinfragmente $di_{F(ab)_2}$ bzw. di_{Fc} mit der Summe der beiden Papainfragmente Fab bzw. mit Fc auch in antigener Hinsicht zu bestätigen, bedienten wir uns der von EDELMAN, HEREMANS und KUNKEL (1960) modifizierten Methode der Immunelektrophorese.

Wir verwendeten hierfür 2%ige Lösungen von IgG-Globulin (Mensch), die mit Papain bzw. Diphthin 10 Std. bei 22°C inkubiert worden waren. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden sowohl die beiden äußeren wie die beiden kurzen, in der Mitte des Objektträgers herausgeschnittenen Agarrillen mit Anti-Human-IgG-Globulin (vom Kaninchen) beschickt.

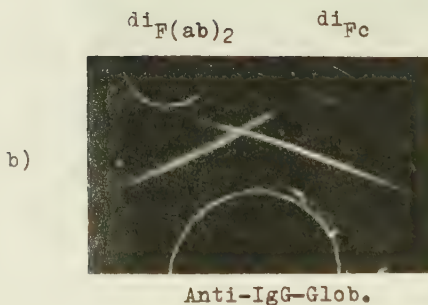
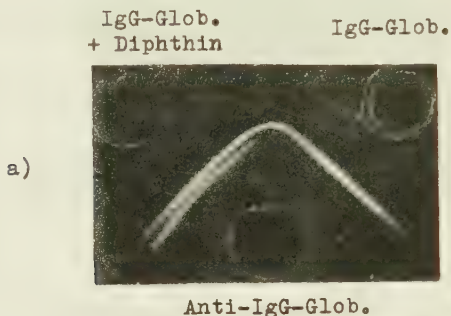
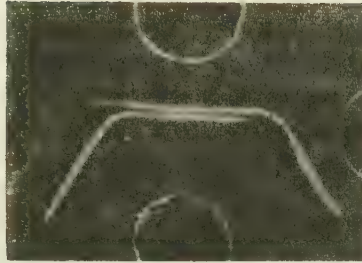


Abb. 7: Agardiffusionstest von intaktem und diphthin-behandeltem IgG-Humanglobulin und dessen Fragmenten $di_F(ab)_2$ und di_{Fc} gegenüber Anti-IgG-Humanglobulin.

Der in der Abbildung 8 wiedergegebene Befund besagt folgendes: Die längs der oberen bzw. der unteren Antiserumrille verlaufenden, jeweils sich überschneidenden Präzipitationslinien von papain- bzw. diphthinbehandeltem IgG-Globulin gleichen sich

Anti-IgG-Glob.

c) Anti- $^{di}F(ab)_2$



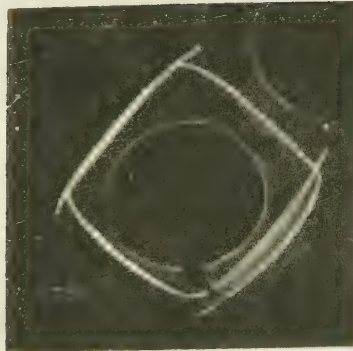
Anti- ^{di}Fc

IgG-Glob.
+ Diphthin

IgG-Glob.

^{di}Fc

d)



Anti-IgG-Glob.

$^{di}F(ab)_2$

IgG-Glob.
+ Diphthin

Abb. 7: Fortsetzung

weitgehend. Am linken Ende des rechten mittleren Antiserumgrabens ist deutlich erkennbar, daß jeweils die Präzipitationslinien der Fragmente Fab und $^{di}F(ab)_2$ bzw. Fc und ^{di}Fc glatt ineinander übergehen, was als ein Beweis für übereinstimmende antigene Eigenschaften zu betrachten ist.



Abb. 8: Modifizierte Immunelektrophorese (nach EDELMAN und Mitarb., 1960) von diphthin- bzw. papainbehandeltem IgG-Humanglobulin gegen Anti-IgG-Serum (x).

G. Die Beeinflussung des Diphthineffekts durch Cystein

Während die volle Wirksamkeit von Papain eine Aktivierung durch reduzierende, z.B. SH-haltige, Substanzen voraussetzt (CEBRA und Mitarb. 1961, DEUTSCH und Mitarb. 1961), ist dies beim Pepsin nicht der Fall. Auch für den Effekt des Diphthins ist offenbar keine derartige Aktivierung notwendig. Hierfür sprach bereits die Erfahrung, daß das Diphthin, das an schwefelhaltigen Aminosäuren nur geringe Mengen von Methionin enthält (SCHIFF 1964d), auch in bloßem Salzmilieu gegenüber gereinigtem IgG-Globulin wirksam ist. Um diese Frage eindeutig zu klären, unterzogen wir je 4 Proben derselben Charge von

IgG-Humanglobulin einer Behandlung mit Papain bzw. mit Diphthin, wobei gleichermaßen Fermenthemmversuche mit Jodacetamid, Jodacetat und Kupfer-II-chlorid als Cysteinhemmern durchgeführt wurden.

Hierzu wurden in 0,01 M Phosphatpuffer (pH 7,5) Lösungen folgender Substanzen hergestellt: Human-IgG-Globulin 8%ig, obige 3 Cysteinhemmer jeweils 0,02 M, Papain (Firma Merck, Darmstadt, 60.000 E/g) 1%ig und Diphthin 0,033%ig. Hiernach wurden 3 Reihen zu je 4 Röhrchen mit je 0,25 ml obiger IgG-Globulinlösung beschickt, worauf in das 1. Röhrchen jeder Reihe 0,25 ml von der ersten Cysteinhemmsubstanz-Lösung hinzugefügt wurde, in jeweils das 2. Röhrchen von der zweiten Hemmlösung usw.. Den 4. Röhrchen jeder Reihe wurde zur Kontrolle lediglich 0,25 ml Phosphatpuffer zugesetzt. - Anschließend füllten wir in alle 4 Röhrchen der 1. Reihe je 0,5 ml Papainlösung, in die der 2. Reihe Diphthinlösung und in die der 3. Reihe zur Kontrolle Phosphatpuffer. Somit resultierte in jedem Röhrchen eine Endkonzentration von 2 % IgG-Globulin. Nach 15 Std. Inkubierung bei 37°C wurden die einzelnen Mischungen mittels der Agar- und Immunelektrophorese untersucht.

Bei diesen Cysteinblockadeversuchen fanden wir, daß durch alle 3 verwendeten Substanzen die proteolytische Wirksamkeit des Papains gehemmt wird, während die des Diphthins unverändert bestehen bleibt. In der Abbildung 9 seien als Beleg hierfür lediglich die mit Jodacetamid erhaltenen immunoelktrophoretischen Resultate wiedergegeben.

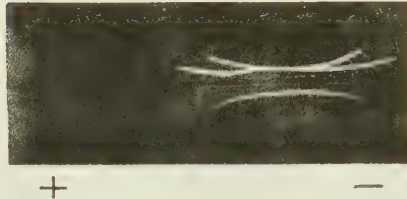
Falls bei der Fragmentierung von IgG-Globulin auf eine Verwendung von Cystein (oder sonstiger Thiolverbindungen) verzichtet wird, äußern demnach Papain, Pepsin und Diphthin folgende unterschiedliche Effekte: Durch Papain werden 3 - 5 Peptidbrücken aufgebrochen, ohne daß eine Veränderung des Molekulargewichts eintritt (CEBRA und Mitarb. 1961). Demgegenüber wird mittels Pepsin das IgG-Globulin in ein 5S-Fragment mit einem Molekulargewicht von etwa 105.000 und zahlreiche kleinere Polypeptide gespalten. Durch Behandlung mit Diphthin hingegen entstehen 2 Fragmente mit Molekulargewichten von 90.000 - 95.000 bzw. 45.000 - 50.000. Somit ähnelt das Diphthin in seiner Wirkung mehr dem Pepsin als dem Papain.

Anders liegen die Verhältnisse, wenn eine Fragmentierung in Gegenwart von SH-Verbindungen abläuft. Hier erfolgt bei Papain durch Sprengung von Disulfidbrücken der erwähnte Bruch in die 3 Fragmente Fab (2mal) und Fc und bei Pepsin zerfällt das

a) Papainbehandeltes IgG-Globulin

ohne Jodacetamid

mit "

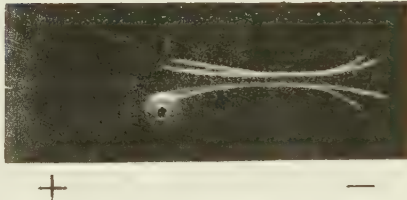


Anti-Humanserum

b) Diphthinbehandeltes IgG-Globulin

ohne Jodacetamid

mit "



Anti-Humanserum

Abb. 9: Immunelektrophoretische Befunde beim Versuch einer Hemmung der proteolytischen Wirksamkeit von Papain und Diphthin auf IgG-Humanglobulin durch SH-Blockade mittels Jodacetamid.

Fragment $F(ab')_2$ in die beiden identischen Bruchstücke Fab' . In beiden Fällen tritt die Reduktion auch bei nachträglichem Zusatz von Thiol ein (CEBRA und Mitarb. 1961; NISONOFF und DIXON 1964). Angesichts dieser Erfahrungen war es nicht unwahrscheinlich, daß auch im Falle des Diphthins die gleichzeitige Verwendung SH-haltiger Substanzen eine Zweiteilung des Fragments $^{d1}F(ab)_2$ bewirken würde.

Zur Klärung dieser Frage nahmen wir die Diphthinbehandlung des IgG-Globulins vom Mensch (Methode s.S. 8) vergleichsweise in NaCl-Lösung wie in Cysteinmilieu (0,01 M) vor. Die bei der agar- und immunelektrophoretischen Untersuchung dieser inkubierten Gemische erhaltenen Befunde sind in der Abbildung 10 einander

ohne Cystein

mit "

+

-

ohne Cystein

mit "



Anti-Humanserum

+

-

Abb. 10: Agar- und Immunelectrophorese von diphthin-behandeltem IgG-Humanglobulin mit und ohne Cysteinzusatz.

gegenübergestellt und zeigen identische Reaktionsbilder. Auf diese Weise konnte also eine zusätzliche Fragmentierung durch Cystein nicht nachgewiesen werden. Dieser Nachweis glückte erst durch eine anschließende Gelfiltration. So ist aus den in der Abbildung 11 wiedergegebenen Elutionsdiagrammen ersichtlich, daß durch Cysteinzusatz eine Verschiebung des Mengenverhältnisses der beiden eluierten Proteinquoten zugunsten der zweiten Fraktion auftritt. Diese Verschiebung konnte nunmehr durch agar- und immunelectrophoretische Untersuchung der eluierten Fraktionen erklärt werden (s. Abbildung 12): Bei Cysteinzusatz enthält die Fraktion II zwei Quoten verschiedener electrophoretischer Beweglichkeit und Antigenität. Während die schnellere Quote $^{di}F_c$ entspricht, stellt die langsamere einen Anteil von alteriertem $^{di}F(ab)_2$ dar. Demnach erfolgt in Gegenwart von Cystein eine Spaltung von $^{di}F(ab)_2$. Durch weitere Untersuchungen, insbesondere durch Molekulargewichtsbestimmungen, ist zu klären, ob dabei zwei verschieden große Bruchstücke entstehen (s. deren differierende Elution) oder aber, als Folge eines unvollständig

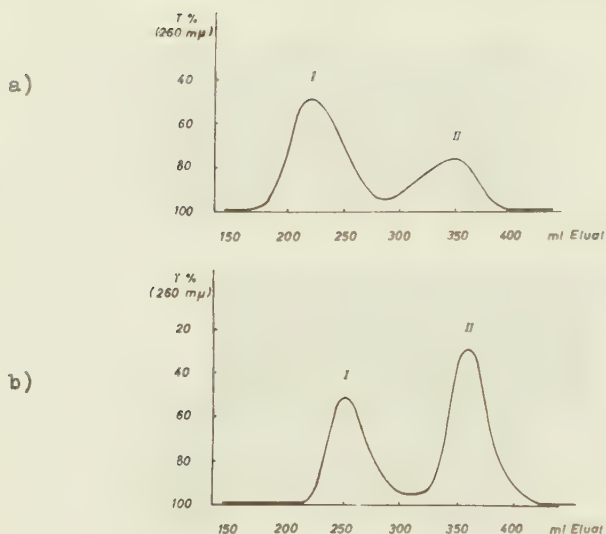


Abb. 11: Gelfiltration (Sephadex G-100, Phosphatpuffer pH 7,3) von IgG-Humanglobulin nach Behandlung mit Diphthin ohne (a) und mit (b) Cysteinzusatz.

abgelaufenen Spaltprozesses, neben einem Rest von $^{di}F(ab)_2$ zwei identische Fragmenthälften $^{di}F(ab)$ resultieren. Diesbezüglich ist bemerkenswert, daß im Falle eines präzipitierenden IgG-Globulins vom Kaninchen die Behandlung mit Diphthin und Cystein den Verlust der präzipitierenden Eigenschaft nach sich zog.

Somit hat die Reduktionswirkung des Cysteins bei einer vorausgehenden oder gleichzeitigen Behandlung von IgG-Globulin (vom Mensch oder Kaninchen) durch Diphthin offensichtlich die gleichen Folgen wie bei bzw. nach einer Proteolyse durch Papain oder Pepsin. Die bei diesen 3 Fermenten vorliegenden Spaltwirkungen seien in der Abbildung 13 an dem von PORTER (1962) gebrachten Strukturmodell des IgG-Globulins veranschaulicht.

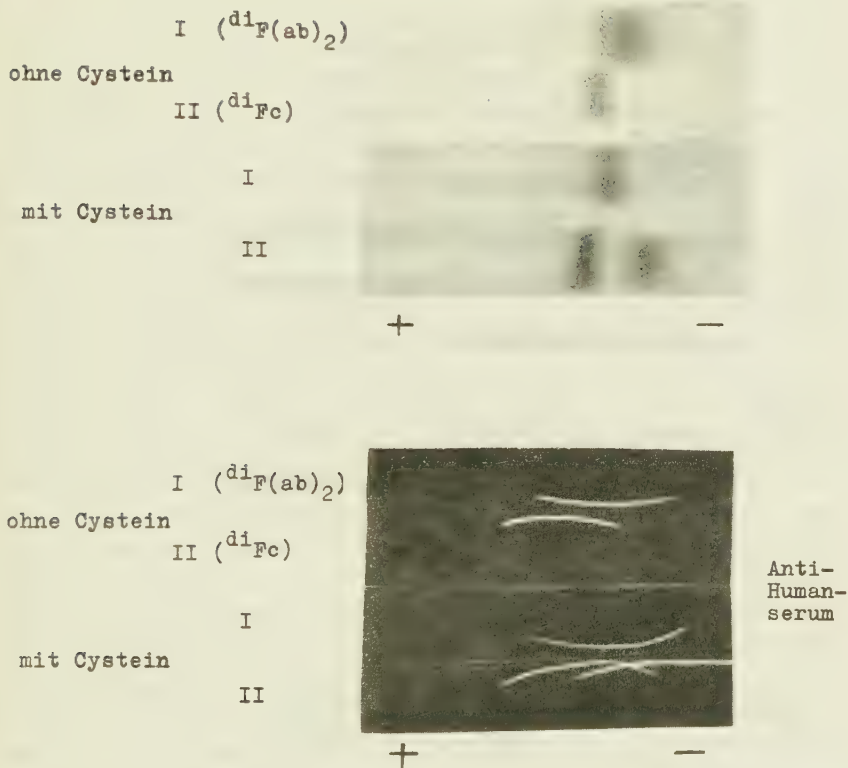


Abb. 12: Agar- und Immunoelktrophorese der durch Gelfiltration (Sephadex G-100, Phosphatpuffer pH 7,3) isolierten Fraktionen I und II von diphthhinbehandeltem IgG-Human-globulin ohne und mit Cysteinzusatz.

Offensichtlich vermögen alle drei Substanzen das IgG-Globulin im gleichen Molekülbereich anzugreifen. Ob dies an identischer Stelle geschieht, ist fraglich, zumal die gering differierenden Molekulargewichte der einzelnen Fragmente auf benachbarte Spaltlinien hinweisen könnten. Jedenfalls scheint die mittlere Region der zwei -Ketten des IgG-Globulinmoleküls gegenüber einem enzymatischen Aufbruch besonders empfindlich zu sein.

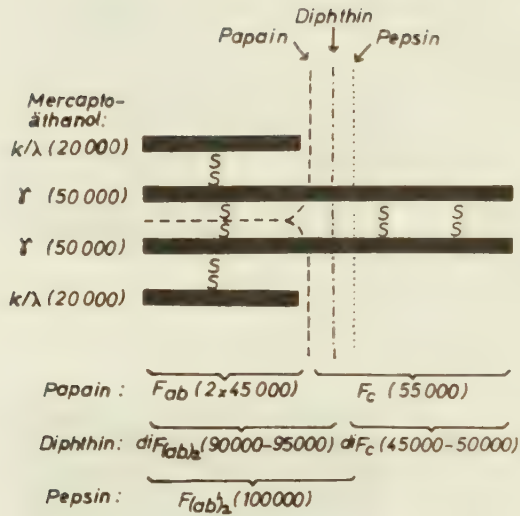


Abb. 13: Strukturschema des IgG-Globulinmoleküls nach PORTER (1962).

III. Besprechung

=====

Nach SCHIFFs ursprünglicher Auffassung bewirkt Diphthin in vitro eine (serologisch nicht erfaßbare) unspezifische Adsorption von gewissen Hämagglutininen und Hämolyseinen. Ein sich bildender Diphthin/Hämagglutinin-Komplex soll intravital, offenbar ähnlich wie ein spezifischer Antigen/Antikörper-Komplex, aus dem strömenden Blut eliminiert werden, wobei dem Diphthin eine Vehikelfunktion zukomme. Als Hinweise auf einen solchen Wirkungsmechanismus sind folgende Erfahrungen betrachtet worden: Der Diphthineffekt beschränkt sich auf die IgG-Globuline von Kaninchen- und Menschenseren, er hat annähernd gleichen Wirkungsgrad bei Inkubationstemperaturen zwischen 5°C und 37°C und er beeinträchtigt in vitro nicht die Antikörperaktivität. Nachdem agar- und immunoelktrophoretisch nachgewiesen wurde, daß nach Inkubation von Kaninchen- oder Menschenseren mit Diphthin die IgG-Globulinfraction in 2 Quoten aufgespalten wird, war die Hypothese eines Adsorptionsvorgangs fragwürdig geworden. Zudem hatten andere Autoren ähnliche Befunde bei der Verdauung von IgG-Globulin mit Proteinasen, insbesondere mit Papain erhalten. Um einer Klärung der Wirkung des Diphthins näherzukommen, führten wir Untersuchungen mit gereinigtem IgG-Globulin durch. Die hierbei erzielten Ergebnisse gleichen in vieler Hinsicht den nach Papaineinwirkung resultierenden Befunden und es erscheint nicht unberechtigt, das Diphthin ebenfalls als ein proteolytisches Ferment anzusprechen. Hierfür spricht insbesondere die Erfahrung, daß z.B. bei 27-stündiger Einwirkung ein maximaler Spalteffekt noch bei einem Molverhältnis von IgG-Globulin : Diphthin von 125 : 1 zu erzielen ist. Gegenüber dem Papain unterscheidet sich aber das Diphthin in folgenden Eigenschaften (s. Tabelle 2): Das Diphthin ist hitzestabil und atoxisch (SCHIFF, 1964d). Es benötigt keine Aktivierung durch Sulfhydrylgruppen und scheint nur mit IgG-Globulin vom Mensch und einigen wenigen Tierspezies zu reagieren. Es zerlegt diese IgG-Globuline in 2 anstelle von 3 Fragmenten, von denen das Fragment $^{di}F(ab)_2$ bivalente Anti-

Körperaktivität besitzt und schließlich ist es fähig, IgG-Globulin sogar in vivo aufzuspalten (SCHIFF, 1964b).

	D i p h t h i n	P a p a i n
Hitzestabilität	+	-
Toxizität bei i.v. Applikation	-	+
Spaltwirkung gegenüber	wahrscheinlich nur IgG-Globulin vom Mensch und wenigen Tierspezies	zahlreichen Proteinen
Aktivierung durch Thiol-Verbindungen notwendig	-	+
Zahl der entstehenden IgG-Globulinfragmente ohne Cysteinzusatz mit "	2 3	0 3
Aufspaltung von IgG-Globulin in vivo	+	-

Tab. 2: Unterschiedliche Eigenschaften von Diphthrin und Papain

Über den Angriffspunkt des Diphthins ist noch nichts bekannt, zumal bisherige Ultrazentrifugationsversuche leicht variierende Sedimentations-Koeffizienten ergaben. Aufgrund von Übereinstimmungen hinsichtlich Antigenität und Antikörperaktivität der vergleichbaren Fragmente darf aber angenommen werden, daß das Diphthrin das IgG-Globulinmolekül in der gleichen Gegend aufspaltet wie Papain und Pepsin.

Diese Befunde und Überlegungen machen es wahrscheinlich, daß die von SCHIFF beschriebene diphthrinbedingte intravitale Antikörperhemmung oder auch das sogenannte SEEMÜLLERSche Hämolyse-schutzphänomen auf einer raschen humoralen Eliminierung des Antikörperfragments $^{di}F(ab)_2$ beruht. Für diese Annahme sprechen die Ergebnisse von Versuchen an Mäusen, denen diphthrinbehandel-

tes bzw. intaktes IgG-Globulin i.v. injiziert und deren Seren 18 Std. später immunoelektrophoretisch auf ihren Gehalt an IgG-Humanglobulinfragmenten untersucht worden war (noch unveröffentlicht). Die gleiche Aussage ist von SPIEGELBERG und WEIGLE (1965) für die Papainfragmente Fab und das Pepsinfragment $F(ab')_2$ getroffen worden. Trotz solcher Ähnlichkeiten muß das Diphthin als ein Ferment von individueller Wirkungsweise angesprochen werden, das in mancher Hinsicht eine Mittelstellung zwischen Papain und Pepsin einnimmt.

IV. Zusammenfassung

=====

Es wurde die Spaltwirkung von Diphthin auf gereinigtes IgG-Globulin von menschlichen Normal- und Plasmocytomseren und von Kaninchenseren untersucht. Hierbei wurde im wesentlichen folgendes festgestellt:

1. Die Spaltwirkung des Diphthins beruht offensichtlich auf einem enzymatischen Effekt. So genügte für eine komplette Spaltung von IgG-Globulin bei z.B. 27-stündiger Inkubierung ein Molverhältnis von Diphthin : IgG-Globulin von 1 : 125.

2. Bei Gelfiltration (Sephadex G-100) von inkubierten IgG-Globulin/Diphthin-Gemischen wurden jeweils zwei Fragmente isoliert, deren Molekulargewichte mit 90.000 - 95.000 bzw. 40.000 - 45.000 bestimmt wurden. Während bei Menschenseren das größere Fragment ($S_{20} = 5,75$) eine langsamere und das kleinere Fragment ($S_{20} = 3,25$) eine schnellere elektrophoretische Beweglichkeit als das native IgG-Globulin besitzt, zeigen bei Kaninchenseren die beiden Fragmente ($S_{20} = 5,03$ bzw. 3,8) unter sich ein umgekehrtes Wanderungsverhalten.

3. Die ausschließlich an das größere Diphthinfragment I gebundene Antikörperaktivität konnte nur für Agglutinine und Präzipitine, dagegen nicht für Hämolysine bzw. komplementbindende Antikörper nachgewiesen werden.

4. Vergleichende Untersuchungen der antisernen Eigenschaften der durch Diphthin- bzw. Papainverdauung erhältlichen IgG-Globulinfragmente ergaben eine weitgehende Identität der Diphthinfraktion I und der beiden Papainfragmente Fab einerseits sowie der Diphthinfraktion II und des Fragments Fc andererseits. Bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte und Antikörperqualitäten ist zu schließen, daß das größere Diphthinfragment der Summe der beiden Papainfragmente Fab bzw. dem 5S-Pepsinbruchstück $F(ab')_2$ gleichkommt, während das kleinere Diphthinfragment dem Papainfragment Fc entspricht. In An-

lehnung an die gebräuchliche Nomenklatur sind daher die beiden Diphthinfragmente mit $^{di}F(ab)_2$ bzw. ^{di}Fc bezeichnet worden.

5. Gegenüber dem Papain unterscheidet sich das Diphthin u.a. in folgenden Eigenschaften: Es benötigt keine Aktivierung durch Sulfhydrylgruppen und scheint nur mit IgG-Globulin vom Mensch und einigen wenigen Tierspezies zu reagieren. Es zerlegt diese IgG-Globuline in 2 Fragmente; bei Zusatz von Thiol entstehen - wie beim aktivierten Papain - deren drei.

V. Literatur

=====

Bull. World Health Org. 30, 447 (1964).

CEBRA, J.J., GIVOL, D., GILMAN, H.J. und KATCHALSKI, E.:
A two-stage cleavage of rabbit γ -globulin by a
water-insoluble papain preparation followed by
cystein. J.Biol.Chem. 236, 1720 (1961).

COHEN, S. und PORTER, R.R.: Structure and biological activity
of Immunoglobulins. In "Advances in Immunology",
4, 287 (1964), Academic Press, London u. New York.

DEUTSCH, H.F., STIEHM, E.R. und MORTON, J.J.: Action of papain
on human serum globulins. J.Biol.Chem. 236, 2216(1961).

EDELMAN, G.M.: Dissociation of γ -globulin. J.Am.Chem.Soc.
81, 3155 (1959).

EDELMAN, G.M. und GALLY, J.A.: The nature of Bence-Jones pro-
teins. J.Exp.Med. 116, 207 (1962).

EDELMAN, G.M. und GALLY, J.A.: A model for the 7S antibody
molecule. Proc.Nat.Acad.Sc. 51, 846 (1964).

EDELMAN, G.M., HEREMANS, M.T. und KUNKEL, H.G.: Immunological
studies of human γ -globulin. J.Exp.Med. 112, 203(1960).

FAHEY, J.L.: Heterogeneity of γ -globulins. In "Advances in
Immunology", 2, 41 (1962), Academic Press, London u.
New York.

FLEISCHMANN, J.B., PAIN, R.H. und PORTER, R.R.: Reduction of
 γ -globulins. Arch.Biochem.Biophys. - Suppl. 1, 174
(1962).

FLEISCHMANN, J.B., PORTER, R.R. und PRESS, E.M.: The arrangement
of peptide chains in γ -globulin. Biochem.J. 88, 220
(1963).

- GOLD, E. und HOLLÄNDER, L.: Gammaglobuline und Immunglobuline. In "Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie" 39, 108 (1965).
- NISONOFF, A. und DIXON, D.J.: Evidence of linkage of univalent fragments or half-molecules of rabbit γ -globulin by the same disulfide bond. Biochemistry 3, 1338 (1964).
- NISONOFF, A. und THORBECKE, G.J.: Immunochemistry. In "Annual Reviews of Biochemistry" 33, 355 (1964).
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C. und WOERNLEY, D.L.: Mechanism of formation of univalent fragments of rabbit antibody. Biochem.Biophys.Research Commun. 1, 318 (1959).
- NISONOFF, A., WISSLER, F.C., LIPMAN, L.N. und WOERNLEY, D.L.: Preparation of univalent fragment from the bivalent rabbit-antibody molecule by reduction of disulfid-bond. Arch.Biochem.Biophys. 89, 230 (1960).
- NOELKEN, M.E., NELSON, Ch.A., BUCHLEY, C.E. und TANFORD, Ch.: Gross conformation of rabbit 7S γ -immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. J.Biol.Chem. 240, 218 (1965).
- PORATH, J. und FLODIN, P.: Gel filtration, a method for desalting and group separation. Nature 183, 1657 (1959).
- PORTER, R.R.: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem.J. 73, 119 (1959).
- PORTER, R.R.: In "Basic problems of neoplastic disease", (herausgeg. von A. Gellhorn und E. Hirschberg), Columbia University Press, N.Y., S. 177 (1962).
- PORTER, R.R.: Structure of antibodies. In "Protides of the biological fluids". (Proc.11.colloqu., Bruges 1963, Elsevier Publ. Amsterdam, London, New York), S. 11 (1964).
- POULIK, M.D.: Starch gel immuno-elektrophoresis. J.Immunol. 82, 502 (1959).
- POULIK, M.D.: Interaction of transferrin, haptoglobin and other serum proteins with neuraminidase of diphtheriatoxin. Clin.Chim.Acta 6, 493 (1961).

- POULIK, M.D.: Electrophoretic Map of Chemically Derived Sub-Units of Papain-Digested γ -Globulin. *Nature* 198, 752 (1963).
- SCHIFF, W.: Über einen in vivo wirksamen antihämolytischen Schutzstoff ("Diphthin") aus Corynebakterien. *Path.Microbiol.* 24, 299 (1961).
- SCHIFF, W.: Über den Hämagglutininbindungs-Mechanismus des Hämolyse-schutzstoffes Diphthin. *Z.Immun.forsch.* 127, 266 (1964a).
- SCHIFF, W.: Über den intravitalen Hämagglutininhemmungs-Mechanismus von Diphthin. *Z.Immun.forsch.* 127, 269 (1964b).
- SCHIFF, W.: Zur Frage der Bindung zwischen Diphthin und Diphtherie-Antitoxin ("Anti-Diphthin"). *Z.Immun.forsch.* 127, 400 (1964c).
- SCHIFF, W.: Physikalisch-chemische und immunologische Eigenschaften von gereinigtem Diphthin. *Z.Immun.forschg.* 127, 479 (1964d).
- SCHIFF, W.: Immuno-elektrophoretische Auftrennung von Serumglobulinen mittels Diphthin. *Zbl.Bakt. I Orig.* 198, 261 (1965).
- SCHULTZE, H.E.: Biologically active protein fragments. In "Protides of the biological fluids". (Proc.12.colloqu., Bruges 1964, Elsevier Publ. Amsterdam, London, New York), S. 1 (1965).
- SINGER, S.J.: Structure and function of antigen and antibody proteins. In "The Proteins" 3, 269 (1965). (Academic Press, London and New York)
- SPIEGELBERG, H.L. und WEIGLE, W.O.: The catabolism of homologous and heterologous 7S gamma globulin fragments. *J.Exp. Med.* 121, 323 (1965).
- STOCKAMP, K.F.: Elektrophoretische und immuno-elektrophoretische Untersuchungen über den Effekt von Diphthin auf die γ -Globuline von normalen und pathologischen Menschen- und Tierseren. *Diss.Med.Marburg* (1966).
- WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z.Naturforsch.* 76, 148 (1952).

Herrn Professor Dr. med. R. SIEGERT bin ich für die mir in seinem Institut zur Verfügung gestellte Arbeitsmöglichkeit zu großem Dank verpflichtet.

Ganz besonders danke ich Herrn Privat-Dozent Dr. med. W. SCHIFF für die Überlassung des Themas und seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Abfassung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 23. 2. 1942 wurde ich, Hans-Christoph W e i s e, als Sohn des Pastors Herbert Weise und seiner Ehefrau Ruth geb. Rieck in Hartfelde, Krs. Wohrlau (Schlesien), geboren. Nach 4 Volksschuljahren in Duingen, Krs. Alfeld, besuchte ich ab 1952 die Leibnizschule in Hannover und bestand dort Ostern 1961 das Abitur. Mit dem Sommersemester 1961 begann ich mein Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn, wo ich am 1. 8. 1963 das Physikum ablegte. Nach 4 klinischen Semestern in Marburg und zwei weiteren in Hamburg bestand ich an letzterer Universität am 22. 12. 1966 das Medizinische Staatsexamen mit der Note "sehr gut".

Vom 15. 1. bis 31. 3. 1967 war ich Medizinalassistent am Hygiene-Institut der Universität Marburg und seit dem 1.4.1967 bin ich in gleicher Eigenschaft an der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses in Melsungen tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Bücher, Cleve, Dimroth, Drawert, du Mesnil de Rochemont, Gedigk, Hamm, Hensel, Heusser, Hohorst, Jacob, Klingenberg, Lang, Linneweh, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, Neubauer, Niessing, Petry, Schiff, Schleyer, Schmid, Schwaiger, Seidel, Siegert, Spiegelberg, Stender, Straub, Streicher, Voigt, Walcher, Würterle;

in Hamburg: Bettendorf, Bierig, Fritz, Gardemin, Hornbostel, Jores, Jungmann, Kautzky, Kracht, Lierse, Lindner, Puff, Schirren, Schröder.

